Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Das cyclische 3',5'-AMP-System von Tube und Uterus unter dem Einfluß von Relaxin und beta-adrenerger Stimulation

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
STEPHAN HILL
aus Killeen/Texas/USA

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0052

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Das cyclische 3',5'-AMP-System von Tube und Uterus unter dem Einfluß von Relaxin und beta-adrenerger Stimulation

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
STEPHAN HILL
aus Killeen/Texas/USA

1985

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H.- J. Ruoff
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. T. H. Lippert

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Klinische Anwendung ß-adrenerger Substanzen	1
1.2.	Das adrenerge Alpha- und Beta- Rezeptoren-modell	1
1.3.	Das cyclische 3;5'- AMP (cAMP)	1
1.4.	Die Adenylatcyclase (AC)	2
1.5.	Relaxin	5
1.6.	Anatomie und Physiologie von Uterus und Tube	6
1.7.	Fragestellung	6
2.	METHODIK	8
2.1.	Untersuchungsmaterial	8
2.2.	Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	8
2.3.	Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität	9
2.4.	Bestimmung des cAMP- Spiegels im Gewebe	10
2.5.	Aufarbeitung des Gewebes zur Bestimmung der Phosphodiesterase	10

		Seite
2.6.	Bestimmung der Phosphodiesteraseaktivität	11
2.7.	Statistische Bearbeitung	11
3.	ERGEBNISSE	12
3.1.	Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Adenylatcyclase	12
3.2.	Wirkung von Fenoterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Maus	12
3.3.	Wirkung von Clenbuterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Maus	18
3.4.	Wirkung von Fenoterol auf die Adenylatcyclaseaktivität der menschlichen Tube	18
3.5.	Wirkung von GMP-PNP, einem stabilen GTP-Analog, auf die Fenoterol- Konzentrations-Wirkungskurve der menschlichen Tube	18
3.6.	Wirkung von Clenbuterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Ratte	22
3.7.	Einfluß von Fenoterol auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus in Gegenwart adrenerger Alpha- und Beta- Antagonisten	25

Seite

3.8. Wirkung von Relaxin auf die Adenylatcyclase der Tube der Maus ohne und unter Einfluß einer adrenergen Beta-Rezeptorenblockade 28

3.9. Wirkung von Clenbuterol 2 h nach i.p. Gabe auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Maus 28

3.10. Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Maus nach dreitägiger Clenbuterolgabe 31

3.11. Intrazellulärer cAMP- Spiegel der Tube der Maus in vivo nach dreitägiger Clenbuterolgabe 33

3.12. Adenylatcyclase und Phosphodiesterase der Tube von Mäusen ohne und mit 5 sec Mikrowellenbestrahlung 33

4. DISKUSSION 36

4.1. Wirkung von Fenoterol und Clenbuterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Maus 36

4.2. Wirkung von Fenoterol auf die Adenylatcyclase der menschlichen Tube 37

4.3. Wirkung von Clenbuterol auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Ratte 38

Seite

4.4. Einfluß adrenerger Alpha- und Beta-Blocker auf die mit Fenoterol stimulierte Adenylatcyclase der Maus 38

4.5. Einfluß von Propranolol auf die mit Fenoterol und Relaxin stimulierte AC der Tube der Maus 39

4.6. In-vivo Applikation von Clenbuterol: Wirkung auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Maus 40

5. ZUSAMMENFASSUNG 42

6. LITERATUR 44

1. EINLEITUNG

1.1. KLINISCHE ANWENDUNG ß- ADRENERGER SUBSTANZEN

SCHON SEIT JAHREN WERDEN $ß_2$ - ADRENERGE AGONISTEN IN DER ASTHMATHERAPIE UND DER PROPHYLAXE UND THERAPIE VORZEITIGER WEHEN (TOKOLYSE) MIT ERFOLG EINGESETZT. IN BEIDEN FÄLLEN IST DAS THERAPEUTISCHE ZIEL DIE ERSCHLAFFUNG DER GLATTEN MUSKULATUR IN DEN BETREFFENDEN ORGANEN. DURCH SYSTEMATISCHE WEITERENTWICKLUNG DER SYMPATHOMIMETIKA KAM MAN VON ADRENALIN AUSGEHEND ÜBER ISOPRENALIN ZU TYPISCHEN $ß_2$ - MIMETIKA WIE FENOTEROL UND CLENBUTEROL, IN DER HOFFNUNG DIE BETRÄCHTLICHEN NEBENWIRKUNGEN AUF DAS HERZ- KREISLAUFSYSTEM ZU REDUZIEREN UND SOMIT VORWIEGEND SELEKTIV DIE $ß_2$ - SPEZIFITÄT AUSZUNÜTZEN.

1.2. DAS ADRENERGE ALPHA- UND BETA- REZEPTORENMODELL

BEREITS 1906 FAND DALE, DAß DAS VEGETATIVE SYMPATHISCHE SYSTEM AUF STIMULATION NICHT EINHEITLICH REAGIERT. ENTSCHEIDEND VORANGETRIEBEN WURDE DIE 2 - REZEPTOREN - THEORIE DURCH AHLQUIST (1948). IN UMFANGREICHEN UNTERSUCHUNGEN AN VERSCHIEDENEN SPEZIES UNTERSCHIED ER ANGRIFFSPUNKTE, DIE SICH VOR ALLEM DURCH NORADRENALIN STIMULIEREN LIEßEN, VON SOLCHEN, DIE BESONDERS DEUTLICHE EFFEKTE AUF ADRENALIN BZW. ISOPROTERENOL ZEIGTEN, UND POSTULIERTE ADRENERGE ALPHA- UND BETA- REZEPTOREN.

1.3. DAS CYCLISCHE 3´,5´- AMP (cAMP)

1957 GELANG EIN WEITERER WICHTIGER SCHRITT IM BESTREBEN, DEN WIRKUNGSMECHANISMUS VON SYMPATHOMIMETIKA GENAUER ZU BESCHREIBEN. RALL ET AL. FANDEN BEI DER ABKLÄRUNG DER HYPERGLYKÄMISCHEN WIRKUNG VON GLUKAGON UND ADRENALIN EINE HITZESTABILE SUBSTANZ, DIE SPÄTER DURCH UNTERSUCHUNGEN VON SUTHERLAND UND RALL (1958) ALS cAMP IDENTIFIZIERT WURDE. DEM ZEITLICHEN ABLAUF BEI DER GLYKOGENOLYSE FOLGEND BESCHRIEB SUTHERLAND

Glukagon und Adrenalin als extrazelluläre "first messenger" und das daraufhin intrazellulär gebildete cAMP als "second messenger". Im Laufe der Zeit wurden weitere Hormone gefunden, die ihre Wirkung ebenfalls durch eine Änderung des intrazellulären cAMP- Spiegels ausüben (Robison et al. 1967):

Glandotrope Hormone:	ACTH, ICSH, LH, MSH, TSH
Glanduläre Hormone:	Adrenalin, Noradrenalin, Glukagon, Parathormon, Oxytocin, Vasopressin
Gewebshormone:	Angiotensin, Prostaglandine, Histamin, Serotonin

1.4. Die Adenylatcyclase (AC)

Auf Grund ihrer Daten entwickelten Sutherland et al. (1966) das "second messenger" - Modell, in dem die AC, ein Enzym, welches cAMP aus ATP bildet, eine zentrale Rolle einnimmt und von welcher inzwischen weitere Einzelheiten bekannt geworden sind. Die selektive Wirkung eines Hormons ("first messenger") auf ein Organ wird durch spezifische Rezeptoren an der Membranaußenseite der Zelle gewährleistet. Durch Rezeptoren - "Transplantationen" und Fusionsexperimente weiß man, daß die Rezeptoren nicht fest an die katalytische Einheit der AC gekoppelt sind, sondern vielmehr frei in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran flottieren und sich erst nach Aktivierung an das sogenannte G - Protein, eine Einheit der AC, ankoppeln. Das G - Protein ist eine nach intrazellulär gerichtete GTP-ase, die das zur Aktivierung der AC benötigte GTP bindet und zu GDP abbaut.

Einige Gewebe sind in Bezug auf ihre Hormone sehr spezifisch, wie z.B. die NNR, die nur auf ACTH mit einem cAMP- Anstieg reagiert. Demgegenüber werden andere, wie z.B. das Fettgewebe, durch eine Vielzahl von Hormonen (ACTH, Glukagon, Adrenalin) beeinflußt.

Nach Bindung eines spezifischen Agonisten an einen ß - Rezeptor erfolgt über eine Konformationsänderung des Rezeptors dessen Interaktion mit dem G - Protein und die Aktivierung der katalytischen Einheit der AC, die den intrazellulären cAMP- Spiegel anhebt. Die resultierende Wirkung aus dem cAMP-Anstieg ist von der individuellen Enzymausstattung der jeweiligen Zelle abhängig (Hardeland, 1971). Als Beispiel der AC-Aktivierung soll die Wirkung von $ß_2$ - Mimetika auf das cAMP-System der glatten Muskelzelle dargestellt werden, das auch als Wirkungsprinzip den in dieser Arbeit (Abb. 1) getesteten Substanzen Fenoterol und Clenbuterol zugrunde liegt.

Wie oben erwähnt bedingt die Rezeptorbindung eines $ß_2$ - Agonisten über das G - Protein eine Aktivierung der AC, die aus ATP (Substrat) durch Abspaltung von Pyrophosphat cAMP bildet (Dobbs und Robison, 1968). cAMP bewirkt in der glatten Muskelzelle eine Aktivierung sämtlicher Calciumpumpen, welche eine Konzentrationssenkung der freien Calcium-Ionen und Auffüllung der intrazellulären Speicher (Mitochondrien, Sarkoplasmatisches Retikulum) und eine transmembranäre Ausschleusung der Calcium-Ionen in den extrazellulären Raum bewirken (Batra, 1972). Bülbring et al. (1967) fanden des weiteren eine Membranstabilisierung und einen Leitfähigkeitsverlust von außen nach innen für Calcium-Ionen. Beide Mechanismen (aktiv und passiv) führen zu einer Abnahme an intrazellulären freien Calcium-Ionen und ab einer Konzentration im Cytosol von weniger als 10^{-7} mol/l zur Relaxation des glatten Muskels. Die Calciumaufnahme in die intrazellulären Speicher und die Ausschleusung aus der Zelle ist ein aktiver Prozeß, da der transmembranäre Calciumgradient vom Extrazellulärraum zum Intrazellulärraum gerichtet ist. So sind manche Autoren der Meinung, daß schon durch die initiale Pyrophosphatabspaltung bei der Bildung des cAMP Energie für diesen Prozeß bereitgestellt wird (Rasmussen und Tenenhouse, 1968).

Das cAMP wird durch die Phosphodiesterase zu 5´- AMP abgebaut. Somit ist der intrazelluläre cAMP- Gehalt zu jedem

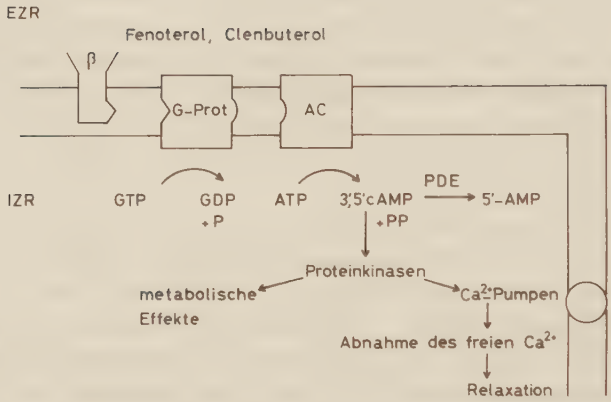

ABB. 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZELLULÄREN WIRKUNG ADRENERGER ß - MIMETIKA.

Zeitpunkt ein Gleichgewicht zwischen Synthese durch die AC und Abbau durch die Phosphodiesterase bzw. Ausschleusung in den Extrazellulärraum. Umfangreiche Untersuchungen ergaben, daß der intrazelluläre cAMP- Anstieg sich proportional zur Relaxation der glatten Muskelzelle verhält (Dobbs und Robison, 1968; Polacek und Daniel, 1971; Kroeger und Marshall, 1974; Uruno et al. 1974).

1.5. Relaxin

Relaxin ist ein Polypeptidhormon mit insulinähnlicher Struktur, das hauptsächlich während der Schwangerschaft in den Ovarien und auch im Blut zahlreicher Spezies gefunden wird (Belt et al. 1971; Sherwood et al. 1975). Die physiologische Bedeutung dieses Hormons ist noch nicht völlig klar, aber gewisse biologische Wirkungen können regelmäßig nachgewiesen werden: Inhibition der spontanen Uteruskontraktilität, Transformation des Bindegewebes der Symphyse und Iliosakralfugen, um eine Ausweitung des Geburtskanals zu ermöglichen, Erweichung der Cervix uteri und des Uterus selbst (Wiqvist et al. 1958; Schwabe et al. 1978). Bereits 1953 beschrieb Sawyer die Unterdrückung der uterinen Kontraktilität durch Relaxin. Dies wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt (Wiqvist, 1959; Rudzik und Miller, 1962; Schwabe et al. 1978). Rudzik und Miller (1962) behaupteten, daß die Relaxinwirkung indirekt durch Freisetzung endogener Catecholamine zustande käme, die ihrerseits auf die ß - Rezeptoren wirken. Diese These wurde von Paterson (1965) und von Sanborn (1981) nicht bestätigt. Sie konnten keinen Einfluß von ß - Blockern auf die Wirkung des Relaxins feststellen (Sanborn, 1980,1981).
B. Sanborn (1982) konnte in in-vitro Versuchen einen Anstieg der cAMP- Konzentration im Uterusgewebe nach Inkubation mit Relaxin feststellen. Von Cheah und Sherwood (1980) wurden Bindungsstudien für dieses ovarielle Hormon mit radioaktiv markiertem Relaxin durchgeführt, wobei der Uterus als ein dominantes Zielorgan dargestellt werden konnte. Neuere Untersuchungen sprechen für einen speziellen Relaxinrezeptor am

Uterus der Ratte (Mercado-Simmen et al. 1982), dessen Dichte auf der Membranoberfläche vom hormonellen Status abhängt.

1.6. Anatomie und Physiologie von Uterus und Tube

Uterus und Tube sind mit dem Ovar und dem endokrinen System die wichtigsten weiblichen Organe der Reproduktion. Eiaufnahme, Weitertransport und Ernährung sind die Hauptfunktionen der Tube in den ersten Tagen nach der Ovulation. Implantation und Weiterentwicklung des befruchteten Eies findet dann im Uterus statt. Alle diese Funktionen sind von hormonellen, humeralen und nervalen Regulationsvorgängen abhängig.
Die anatomische Unterteilung der Tube erfolgt in Infundibulum, Ampulla, Pars interstitialis und Isthmus, deren morphologische Schichten aus der inneren autochtonen Muskulatur (1), der Gefäßmuskelschicht (2) und der subperitonealen Muskelschicht (3) bestehen.
Der Uterus gliedert sich in Fundus, Corpus und Cervix.
Die gesamte Muskulatur von Tube und Uterus besteht aus glatten Muskelzellen. Wie an anderen Organen aus glatter Muskulatur konnten auch an Tube und Uterus ein cAMP- Anstieg durch AC- Stimulation mit Catecholaminen und eine Unterdrückung der Spontanmotilität und Relaxation des Muskeltonus festgestellt werden (Dobbs und Robison, 1968; Polacek und Daniel, 1971; Triner et al. 1971; Uruno et al. 1974; Harbon und Clauser, 1971; Kroeger und Marshall, 1974). Diese Wirkung konnte ebenfalls durch eine Phosphodiesterasehemmung mit Methylxanthinen erreicht werden (Czekanowski, 1973).

1.7. Fragestellung

Die vorliegende Studie untersucht die Wirkung von adrenergen β_2 - Sympathomimetika auf das cAMP- System von Tube und Uterus, um die Interaktion mit diesem System unter verschiedenen Bedingungen und bei verschiedenen Spezies einschließlich des Menschen näher zu charakterisieren.

Außerdem wurde der Einfluß von Relaxin untersucht, um die Frage der direkten oder indirekten Wirkung dieses Hormons an der Muskelzelle eindeutig festzulegen. Allerdings konnten die Studien mit Relaxin nur in begrenztem Umfang durchgeführt werden, da das Hormon nur in kleinen Mengen zur Verfügung stand.

2. METHODIK

2.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

A) 20 - 25 G SCHWERE VIRGINELLE WEIBLICHE MÄUSE DER FIRMA JANTZ, KIßLEGG,

B) VIRGINELLE WEIBLICHE WISTAR- RATTEN MIT EINEM DURCHSCHNITTLICHEN GEWICHT VON 160 - 180 G (ZUCHT DES PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUTS TÜBINGEN) UND

C) MENSCHLICHE TUBEN, OPERATIONSMATERIAL DER UNIVERSITÄTS-FRAUENKLINIK TÜBINGEN.

2.2. AUFARBEITUNG DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS

A) DIE MÄUSE WURDEN DEKAPITIERT, DAS ABDOMEN ERÖFFNET UND JEWEILS DER UTERUS UND DAS MITTLERE DRITTEL EINER TUBE ENTNOMMEN UND VON ANHAFTENDEM FETT- UND PERITONEALGEWEBE BEFREIT. DAS GEWEBE WURDE SOFORT GEWOGEN UND ANSCHLIEßEND IN EINEM ENTSPRECHENDEN VOLUMEN EINES EISKALTEN MEDIUMS MIT EINEM GLASHOMOGENISATOR HOMOGENISIERT (ENDKONZENTRATION: 10 MG GEWEBE/ML HOMOGENAT).
DAS HOMOGENISATIONSMEDIUM SETZTE SICH ZUSAMMEN AUS:

25 MMOL/L TRIS-HCL PUFFER (PH = 7.8)
0.1 MMOL/L EDTA
0.1 MMOL/L DITHIOTHREITOL

B) BEI DER AUFARBEITUNG DER RATTENTUBEN UND -UTERI WURDE IN GLEICHER WEISE VERFAHREN.

C) DIE MENSCHLICHEN TUBEN ENTSTAMMTEN OPERATIONSPRÄPARATEN NACH ABDOMINELLER HYSTEREKTOMIE UND WURDEN SOFORT TIEFGEFROREN. DIE WEITERE PRÄPARATION UND AUFARBEITUNG WAR ENTSPRECHEND.

2.3. Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität

Das Prinzip der AC- Bestimmung beruht auf der Messung von neugebildetem cAMP aus ATP. 10 µL Homogenat (≙ 100 µg Gewebe) wurden zu einem Inkubationsmedium pipettiert, welches wie folgt zusammengesetzt war:

10 mmol/L $MgCl_2$
10 mmol/L Theophyllin (als Phosphodiesterasehemmer)
1 mmol/L ATP (als Substrat)
10 U/mL Kreatinkinase und
15,6 mmol/L Kreatinphosphat (als ATP- regenerierendes System)
1 mg/mL Albumin
variierende Konzentrationen von Testsubstanzen (Fenoterol, Clenbuterol, Phentolamin, Propranolol, Relaxin)

Der Ansatz - das Gesamtvolumen betrug 120 µL - wurde für 20 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert und danach die Reaktion im Hitzeblock gestoppt. Die Inkubationsbedingungen waren bereits durch systematische Änderungen der Einzelkomponenten optimiert worden (Ruoff et al. 1979). Die cAMP- Bildung war während der 20 min Inkubation linear, wie sich aus Versuchen ergab (Abb. 2 und 3). Als Basalwert diente die ohne Testsubstanz inkubierte Probe. Nach dem Hitzestop wurden pro Inkubationsgefäß 50 µL Wasser und 30 mg Al_2O_3 zugegeben (um restliches, unverbrauchtes ATP zu binden, das die cAMP- Messung sonst stören würde), gut durchgeschüttelt und bei 2000·g für 5 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden zwei Proben (zu jeweils 50 µL) abpipettiert und zur cAMP- Bestimmung mit dem Proteinbindungstest nach Gilman (1970) weiter verwendet. Die Ergebnisse wurden in pmol cAMP/mg Protein und 20 min Inkubationsdauer angegeben. Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry et al. (1951) durchgeführt, wobei Rinderserumalbumin als Standardprotein eingesetzt wurde.

2.4. Bestimmung des cAMP- Spiegels im Gewebe

Mäuse erhielten über drei Tage um 7 und 19 Uhr Clenbuterol subkutan und anschließend wurde der zelluläre cAMP- Spiegel der Tuben bestimmt. Um postmortale enzymatische Aktivitäten der AC und der Phosphodiesterase auszuschließen, die den in-vivo cAMP- Spiegel verfälschen würden, wurden die Mäuse im Mikrowellenofen (5 sec) getötet. Intraabdominelle Temperaturmessungen sofort nach Bestrahlung ergaben im Mittel 87 ± 4°C. Diese Temperaturerhöhung reicht aus, um die Enzymsysteme zu denaturieren, wie frühere AC- und Phosphodiesterase- Aktivitätsbestimmungen an Ratten ergaben (Ruoff et al. 1977). Das Tubengewebe wurde in neun Volumenteilen 5%iger Trichloressigsäure homogenisiert und bei 2000·g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Zugabe von 100 µL 1N-HCl fünfmal mit dem doppelten Volumen wassergesättigten Äthers ausgeschüttelt, um die Trichloressigsäure zu entfernen, und dann gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 50 µL 50 mmol/L Na- Acetat (pH = 4) wieder gelöst und der Proteinbindungsassay nach Gilman (1970) zur cAMP- Bestimmung durchgeführt.

2.5. Aufarbeitung des Gewebes zur Bestimmung der Phosphodiesterase

Verwendet wurden die Tuben von dekapitierten oder 5 sec im Mikrowellenofen bestrahlten Mäusen. Die Präparation erfolgte wie unter 2.2. beschrieben. Die Gewebsprobe wurde in einem Puffer bestehend aus 50 mmol/L Tris-HCl und 5 mmol/L Mg- Acetat homogenisiert.

2.6. Bestimmung der Phosphodiesteraseaktivität

Die Phosphodiesteraseaktivität wurde nach dem Verfahren von Pöch (1971) bestimmt. Tritium markiertes cAMP wird durch die Phosphodiesterase zu H^3-5'-AMP abgebaut, welches nach Reaktionsstop (Zugabe von $ZnSO_4$) und durch Fällung mit $Ba(OH)_2$ quantitativ entfernt wird. Die Phosphodiesteraseaktivität ergibt sich aus der Differenz der Radioaktivität einer sofort und einer nach 20 min Inkubation gestoppten Probe. Für die Messung wurden 100 µL Homogenat (≙ 10 mg Gewebe) in folgender Lösung für 20 min bei 37°C inkubiert:

100 mmol/L Tris- HCl (pH = 7.5)
3 mmol/L Mg- Acetat
2 mmol/L 5'-AMP
0.1 mmol/L cAMP
0.05 pmol/L H^3-cAMP

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µL 0.17 mol/L $ZnSO_4$ und Eintauchen des Teströhrchens in Eis gestoppt; das H^3-5'-AMP/5'-AMP Gemisch durch Ausfällung mit 200 µL 0.15 mol/L $Ba(OH)_2$ und Zentrifugation bei 2000·g für 10 min entfernt und die Radioaktivität des Überstandes (300 µL) gemessen.

2.7. Statistische Bearbeitung

Mittelwertsprogramm und t- Test für Paare bzw. Gruppen wurden mit den Logarithmen der Einzelwerte gerechnet; die Ergebnisse wurden als Antilogarithmen dargestellt. Dieses Vorgehen wurde deshalb gewählt, weil in früheren Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte, daß die Aktivitäten der AC logarithmisch verteilt sind (Ruoff et al. 1979). Aus diesem Grunde wird im Ergebnisteil die Streuung der Werte, ausgedrückt als Fehler des Mittelwerts, jeweils durch zwei Werte repräsentiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. VERSUCHSBEDINGUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER ADENYLATCYCLASE

DER AC- ASSAY WURDE IN BEZUG AUF DIE ENZYMMENGE PRO ANSATZ UND DIE ZEITABHÄNGIGKEIT FÜR TUBEN- UND UTERUSGEWEBE ÜBERPRÜFT. DAZU WURDEN BASALWERTE SOWIE MIT FENOTEROL BZW. NAF (MAXIMALE STIMULATION) VERSETZTE GEWEBSHOMOGENATE GEMESSEN.

ZEITABHÄNGIGKEIT

WIE AUS ABB. 2 UND 3 ZU ERSEHEN IST, FAND SICH ÜBER DEN GESAMTEN ZEITVERLAUF VON 15 BZW. 25 MIN UNTER ALLEN BEDINGUNGEN EINE KONSTANTE CAMP- BILDUNGSRATE. AUF GRUND DIESER ERGEBNISSE WURDE DIE INKUBATIONSZEIT FÜR ALLE VERSUCHE AUF 20 MIN FESTGELEGT, DA ZU DIESEM ZEITPUNKT DIE REAKTION NOCH LINEAR VERLIEF UND AUßERDEM GENÜGEND CAMP FÜR DIE MESSUNG GEBILDET WURDE.

ENZYMABHÄNGIGKEIT

IN ABB. 4 UND 5 IST DER KURVENVERLAUF BEI ZUNEHMENDER ENZYMMENGE IM ASSAY DARGESTELLT. IN FOLGE EINER LINEAREN BEZIEHUNG ZWISCHEN CAMP- BILDUNG UND ENZYMMENGE UND AUS PRAKTISCHEN ERWÄGUNGEN WURDE EINE HOMOGENATMENGE VON 100 µG IN ALLEN WEITEREN VERSUCHEN EINGESETZT.

3.2. WIRKUNG VON FENOTEROL AUF DIE ADENYLATCYCLASEAKTIVITÄT VON TUBE UND UTERUS DER MAUS

IN ABB. 6 SIND DIE ERGEBNISSE DER FENOTEROL- KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVE (10^{-8} BIS 10^{-3} MOL/L) AUFGEZEICHNET. DER BASALWERT DER TUBEN LAG IM MITTEL ± SEM BEI 267 (232 - 306) PMOL CAMP/MG PROTEIN·20 MIN. DIE MAXIMALE STIMULATION ERGAB SICH BEI EINER KONZENTRATION VON 10^{-4} MOL/L ($p < 0.01$) MIT 458 (379 - 553) PMOL CAMP/MG PROTEIN·20 MIN.

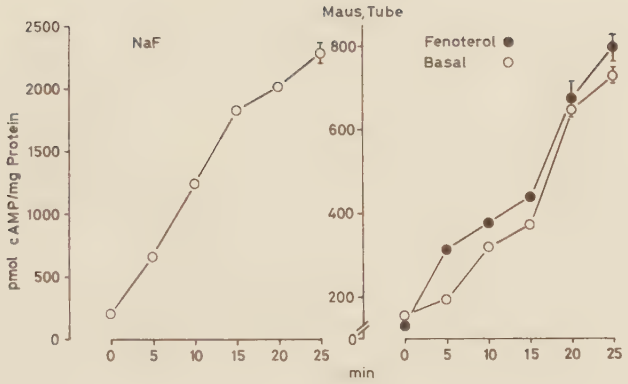

Abb. 2 Zeitabhängigkeit der Aktivierung der Adenylatcyclase der Tube der Maus.
Linke Seite: Stimulation durch 10^{-2} mol/l NaF
Rechte Seite: Basalaktivität 0 — 0 und durch 10^{-5} mol/l Fenoterol ● — ● stimulierte Adenylatcyclase.
Von der Tube einer Maus wurde ein Gewebestück entnommen, homogenisiert und in jeweils n = 10 Proben die AC- Aktivität gemessen. Bei den Versuchen der Abb. 3 - 5 wurde entsprechend verfahren. Bei allen Abbildungen sind jeweils der Mittelwert ± Fehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

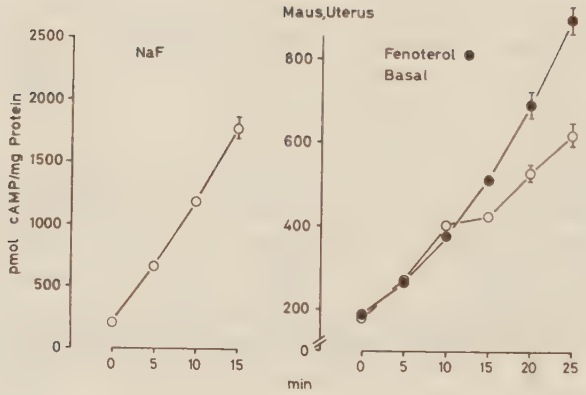

ABB. 3 ZEITABHÄNGIGKEIT DER ADENYLATCYCLASE DES UTERUS DER MAUS.
LINKE SEITE: STIMULATION DURCH 10^{-2} MOL/L NaF
RECHTE SEITE: BASALAKTIVITÄT O — O UND DURCH 10^{-5} MOL/L FENOTEROL ● — ● STIMULIERTE ADENYLATCYCLASE.

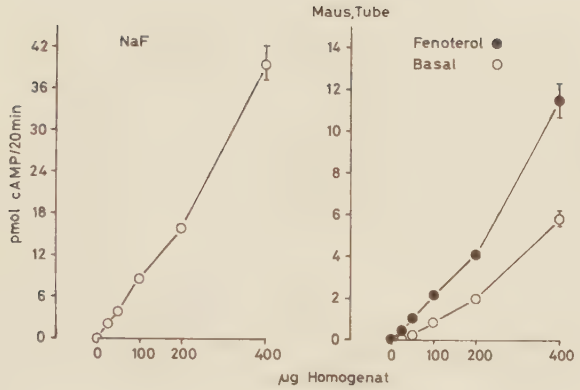

Abb. 4 Aktivität der Adenylatcyclase der Tube der Maus in Abhängigkeit von der Homogenatmenge.
Linke Seite: Stimulation durch 10^{-2} mol/l NaF
Rechte Seite: Basalaktivität 0 — 0 und durch 10^{-5} mol/l Fenoterol ● — ● stimulierte Adenylatcyclase.

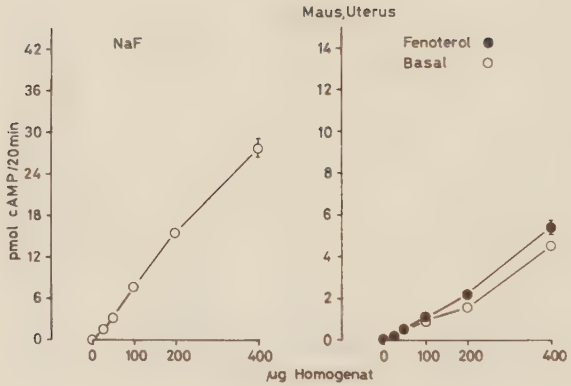

Abb. 5 Aktivität der Adenylatcyclase des Uterus der Maus in Abhängigkeit von der Homogenatmenge.
Linke Seite: Stimulation durch 10^{-2} mol/l NaF
Rechte Seite: Basalaktivität 0 — 0 und durch 10^{-5} mol/l Fenoterol ● — ● stimulierte Adenylatcyclase.

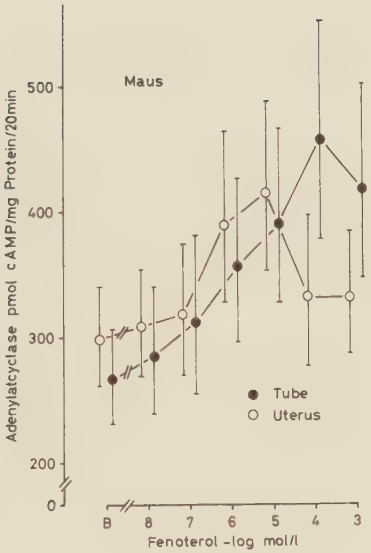

Abb. 6 Wirkung von Fenoterol (10^{-8} bis 10^{-3} mol/l) auf die Adenylatcyclase von Tube ● — ● und Uterus ○ — ○ der Maus (n = 6). B: Basalaktivität.

Die Basalaktivität des Uterus lag etwas höher bei 299 (262 - 341) pmol, der maximalstimulierte Wert war bereits bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/l ($p < 0.01$) erreicht und betrug 415 (353 - 489) pmol cAMP/mg Protein·20 min.

3.3. Wirkung von Clenbuterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Maus

Die Konzentrations- Wirkungskurve für Clenbuterol wurde in einem Bereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/l erstellt (Abb. 7). Der Basalwert des Tubengewebes betrug diesmal 141 (71 - 281) pmol cAMP/mg Protein·20 min. Die AC- Aktivität erreichte unter 10^{-3} mol/l ($p > 0.05$) mit 373 (308 - 452) pmol einen annähernden Maximalwert.
Die Untersuchungen des Uterus erbrachten einen Basalwert von 209 (170 - 257) pmol und eine maximale Stimulation durch 10^{-4} mol/l ($p > 0.05$) von 327 (305 - 351) pmol.

3.4. Wirkung von Fenoterol auf die Adenylatcyclaseaktivität der menschlichen Tube

Die Fenoterol- Konzentrations- Wirkungskurve der menschlichen Tube wurde in einem Bereich von 10^{-7} bis 10^{-2} mol/l untersucht (Abb. 8). Die Basalaktivität betrug 166 (136 - 202) pmol cAMP/mg Protein·20 min, der Höchstwert der Stimulation wurde durch 10^{-4} mol/l ($p < 0.02$) erreicht und lag bei 273 (247 - 303) pmol.

3.5. Wirkung von GMP-PNP, einem stabilen GTP- Analog, auf die Fenoterol- Konzentrations- Wirkungskurve der menschlichen Tube

Abb. 9 zeigt den Einfluß von Fenoterol (10^{-7} bis 10^{-4} mol/l) auf die AC der menschlichen Tube ohne und in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l GMP-PNP (Guanylyl-imido-diphosphat). Dieser Versuch wurde unternommen, um den Einfluß von GTP, welches für die hormonelle Aktivierung erforderlich ist, herauszufinden.

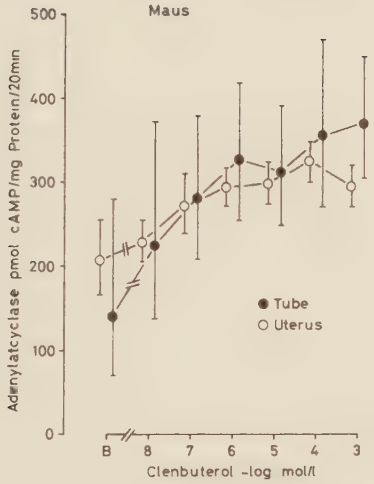

Abb. 7 Wirkung von Clenbuterol (10^{-8} bis 10^{-3} mol/l) auf die Adenylatcyclase von Tube ● — ● und Uterus ○ — ○ der Maus (n = 6).

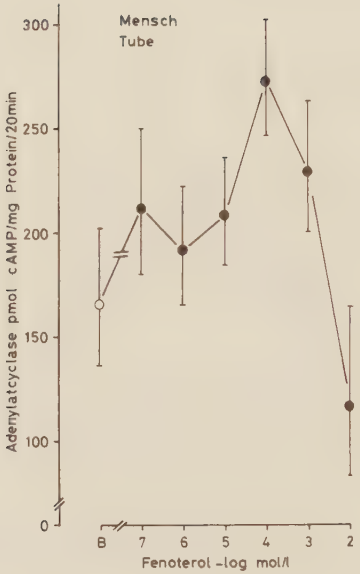

ABB. 8 WIRKUNG VON FENOTEROL (10^{-7} BIS 10^{-2} MOL/L) AUF DIE ADENYLATCYCLASE DER MENSCHLICHEN TUBE (N = 6).

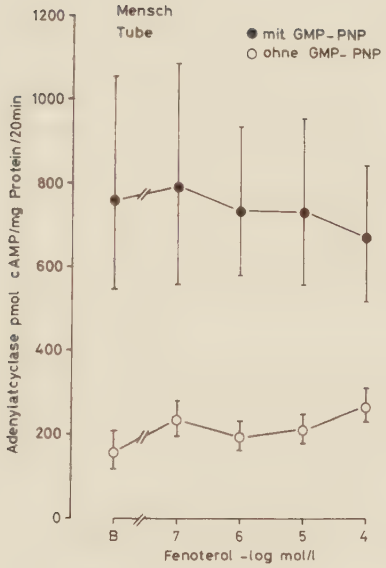

Abb. 9 Wirkung von Fenoterol (10^{-7} bis 10^{-4} mol/l) auf die Adenylatcyclase der menschlichen Tube ohne 0 — 0 und in Gegenwart ● — ● von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l GMP-PNP (n = 4).

Fenoterol ohne GMP-PNP bewirkte einen ähnlichen Verlauf der Konzentrations- Wirkungskurve wie in 3.4. mit einem Anstieg von basal 158 (124 - 210) pmol cAMP/mg Protein·20 min auf einen Maximalwert von 268 (228 - 314) pmol durch 10^{-4} mol/l. Unter GMP-PNP wird bereits die basale cAMP- Syntheserate um rund 500 pmol angehoben, aber durch Fenoterol kann dieser Wert nicht weiter erhöht werden. Es resultiert eher eine fallende Tendenz des Kurvenverlaufs, und ausgehend vom Basalwert von 760 (547 - 1057) pmol cAMP/mg Protein·20 min findet sich ein nicht signifikanter Abfall auf 674 (519 - 875) pmol.

3.6. Wirkung von Clenbuterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Ratte

In diesen Versuchen wurde der Einfluß einer Estradiolbehandlung auf die Wirkung $ß_2$ - mimetischer Stimulation der AC untersucht. Deshalb wurde eine Gruppe eine Woche vor dem Versuch einmalig mit 25 µg/100 g Körpergewicht Estradiol (Progynon^R B) intramuskulär behandelt, während die Kontrollgruppe eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung erhielt.

Der Basalwert des Tubengewebes der mit Estradiol stimulierten Ratten (Abb. 10) lag bei 154 (133 - 177) pmol cAMP/mg Protein·20 min, der Maximalwert fand sich bereits bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l ($p > 0.05$) und betrug 188 (158 - 224) pmol. Er lag damit nur 34 pmol über dem Ausgangswert. Trotzdem zeigte sich eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l, da durch 10^{-8} mol/l Clenbuterol die AC- Aktivität unter den Basalwert gesenkt wurde.

Der Basalwert der Kontrollgruppe lag bei 150 (111 - 203) pmol cAMP/mg Protein·20 min, der Maximalwert wurde aber erst bei einer 100fach höheren Konzentration, nämlich bei 10^{-4} mol/l erreicht und betrug 192 (149 - 246) pmol ($p > 0.05$).

Von denselben Ratten der beiden unterschiedlich behandelten Gruppen wurden auch die Uterusdaten gewonnen.

Der Basalwert der Estradiol- Ratten (Abb. 11) lag bei 191 (172 - 211) pmol cAMP/mg Protein·20 min, der Maximalwert, der

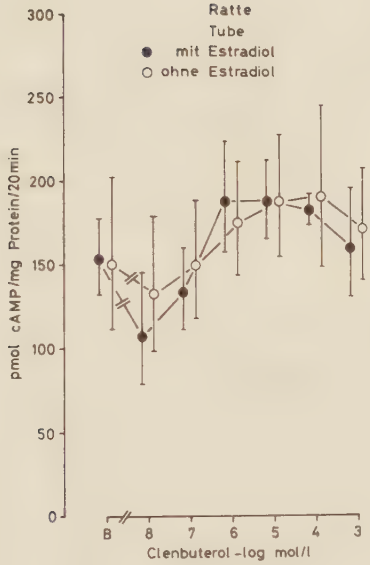

Abb. 10 Wirkung von Clenbuterol (10^{-8} bis 10^{-3} mol/l) auf die Adenylatcyclase der Tube von Ratten ohne O — O und mit ● — ● 25 µg/100 g KG Estradiolbenzoat (Progynon^{R} B) i.m. Vorbehandlung (n = 6).

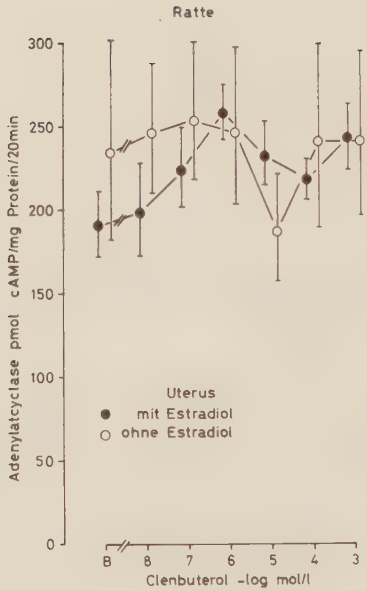

ABB. 11 WIRKUNG VON CLENBUTEROL (10^{-8} BIS 10^{-3} MOL/L) AUF DIE ADENYLATCYCLASE DES UTERUS VON RATTEN OHNE 0 — 0 UND MIT ● — ● 25 µG/100 G KG ESTRADIOL-BENZOAT (PROGYNON^{R} B) I.M. VORBEHANDLUNG (N = 6).

bei 10^{-6} mol/l ($p > 0,05$) erreicht wurde, bei 258 (242 - 276) pmol. Der Basalwert der Kontrollgruppe war mit 234 (182 - 302) pmol etwas höher und ließ sich bei dieser Gruppe auch so gut wie nicht stimulieren. Durch eine Konzentration von 10^{-7} mol/l ($p > 0,05$) kam es somit auch nur zu einer unwesentlichen Erhöhung auf 253 (214 - 301) pmol. Übereinstimmend kam es bei beiden Gruppen zu einem Abfall der Enzymaktivität, wenn Konzentrationen höher als 10^{-6} mol/l eingesetzt wurden.

3.7. Einfluß von Fenoterol auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus in Gegenwart adrenerger Alpha- und Beta-Antagonisten

Die Ergebnisse, die an der Tube der Maus gewonnen wurden, zeigt Abb. 12. Es wurde ein Basalwert von 264 (229 - 303) pmol cAMP/mg Protein·20 min gefunden, der durch Fenoterol (10^{-5} mol/l) auf 685 (612 - 767) pmol signifikant ($p < 0,001$) angehoben werden konnte. Dieser Anstieg wurde durch die adrenergen Alpha- (Phentolamin) und Beta- (Propranolol) Blocker in sehr unterschiedlicher Weise beeinflußt; d.h. die AC- Aktivität wurde nur durch Propranolol in den Konzentrationen 10^{-7}, $3 \cdot 10^{-7}$ und 10^{-6} mol/l signifikant ($p < 0,05$) gehemmt. Durch 10^{-6} mol/l Propranolol wurde sogar ein minimaler Wert von 327 (258 - 415) pmol erreicht, der nur wenig über dem Niveau der Basalaktivität lag ($p < 0,01$).
Demgegenüber bewirkte der Alpha- Blocker Phentolamin eher einen Anstieg der AC- Aktivität, die durch 10^{-6} mol/l ($p < 0,005$) sogar auf einen Wert von 810 (676 - 970) pmol gesteigert werden konnte.
Die entsprechenden Ergebnisse, die am Uterus der Maus gewonnen wurden, zeigt Abb. 13.
Der Basalwert lag bei 286 (222 - 369) pmol cAMP/mg Protein·20 min und wurde durch 10^{-5} mol/l Fenoterol auf 659 (547 - 793) pmol stimuliert ($p < 0,005$). Dieser Anstieg wurde wiederum nur durch Propranolol reduziert. Durch bereits $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l sank die AC- Aktivität auf 341 (241 - 483) pmol, d.h. Basalaktivitätsniveau ab ($p < 0,005$).

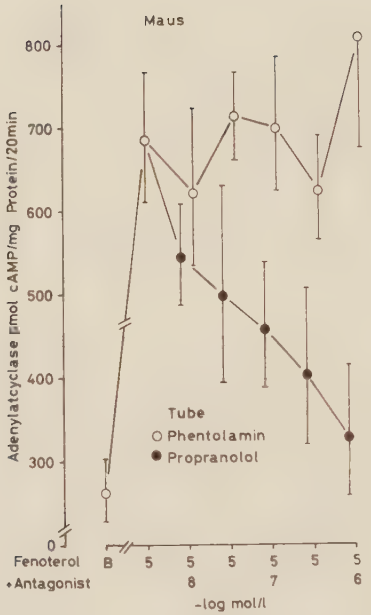

Abb. 12 Einfluß adrenerger (10^{-8} bis 10^{-6} mol/l) Alpha- (Phentolamin ○) und Beta- Blocker (Propranolol ●) auf die Fenoterol (10^{-5} mol/l) stimulierte Adenylatcyclase der Tube der Maus (n = 6).

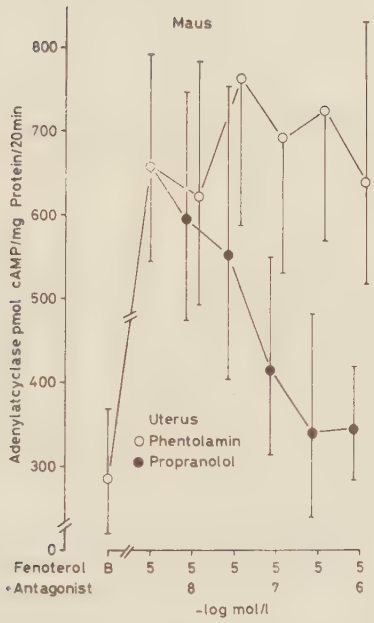

Abb. 13 Einfluß adrenerger (10^{-8} bis 10^{-6} mol/l) Alpha- (Phentolamin ○) und Beta- Blocker (Propranolol ●) auf die Fenoterol (10^{-5} mol/l) stimulierte Adenylatcyclase des Uterus der Maus (n = 6).

Phentolamin zeigte übereinstimmend wiederum einen gegenteiligen Effekt. Die höchste Stimulation unter Alpha- Blockade lag diesmal bei $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l ($p > 0,05$) und betrug 765 (589 - 995) pmol. Dieser Wert konnte wegen der großen Streuung allerdings statistisch nicht gesichert werden.

3.8. Wirkung von Relaxin auf die Adenylatcyclase der Tube der Maus ohne und unter Einfluß einer adrenergen Beta-Rezeptorenblockade

Bei diesen Untersuchungen mit $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l Relaxin wurde zum Vergleich in denselben Gewebeproben die Wirkung von Fenoterol in äquimolarer Konzentration mitbestimmt (Abb. 14).
Der mittlere Basalwert dieser Gewebeproben betrug 228 (199 - 262) pmol cAMP/mg Protein·20 min und stieg unter Relaxin alleine signifikant ($p < 0,05$) auf 327 (295 - 349) pmol an. Fenoterol allein war wirksamer und bewirkte einen Anstieg ($p < 0,01$) auf 512 (424 - 618) pmol.
Nach Zugabe von Propranolol (10^{-7} und 10^{-6} mol/l) zeigte der Relaxinwert unter der höheren Konzentration steigende Tendenz und erreichte 371 (351 - 392) pmol ($p < 0,05$), während unter Fenoterol die AC- Aktivität wie zu erwarten durch 10^{-6} mol/l Propranolol fast vollständig gehemmt wurde und auf 276 (237 - 322) pmol abfiel.

3.9. Wirkung von Clenbuterol 2 h nach i.p. Gabe auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Maus

Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt.
Wirkung auf die Tube: Clenbuterol wurde in Mengen von 10, 50, 100, 500 und 1000 µg/Maus vor Versuchsbeginn i.p. gegeben. 2 h nach Applikation wurden die Tiere getötet und die Bestimmung der AC- Aktivität durchgeführt. Die Kontrollen erhielten physiologische Kochsalzlösung. Basal (Kontrollen) ergab sich ein Wert von 226 (208 - 346) pmol cAMP/mg Protein·20 min, der unter 10 µg Clenbuterol auf 145 (125 - 168) pmol abfiel, um dann wieder auf Basalhöhe anzusteigen und erneut abzufallen.

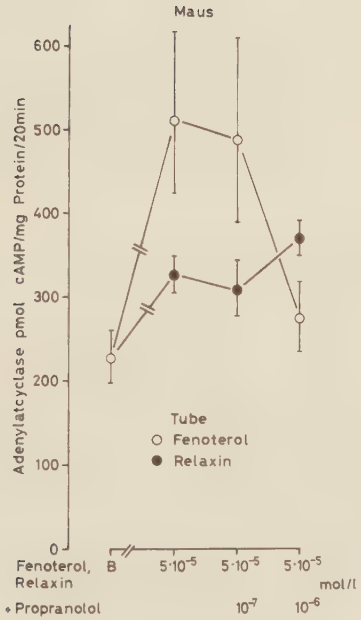

ABB. 14 EINFLUß VON PROPRANOLOL (10^{-7} UND 10^{-6} MOL/L) AUF DIE FENOTEROL O ($5 \cdot 10^{-5}$ MOL/L) UND RELAXIN ● ($5 \cdot 10^{-5}$ MOL/L) STIMULIERTE ADENYLATCYCLASE DER TUBE DER MAUS (N = 4).

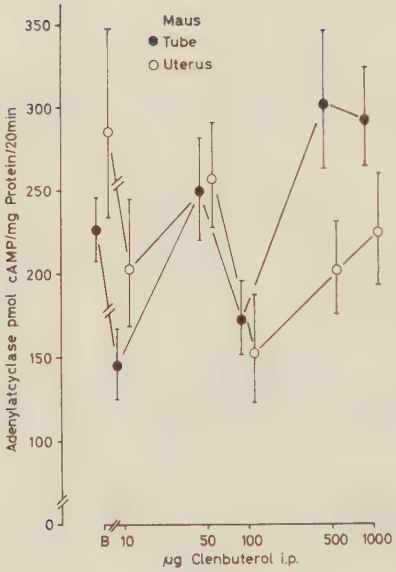

Abb. 15 Adenylatcyclaseaktivität von Tube ● — ● und Uterus ○ — ○ der Maus 2h nach i.p. Gabe von 10 - 1000 µg Clenbuterol pro Maus (n = 6/Dosis). Abszisse: logarithmischer Maßstab.

Unter den beiden höchsten Konzentrationen von 500 und 1000 µg wurde dann ein Plateau um 300 pmol erreicht.
Wirkung auf den Uterus: Von denselben Tieren wurde auch der Uterus untersucht und ein entsprechender Zick-Zack- Verlauf der Konzentrations- Wirkungskurve beobachtet. Der Basalwert war der höchste gemessene Wert und betrug 285 (234 - 347) pmol cAMP/mg Protein·20 min. Der geringste Wert lag bei 152 (123 - 188) pmol und wurde unter einer Dosis von 100 µg gemessen.

3.10. Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Maus nach dreitägiger Clenbuterolgabe

Fünf Versuchstiergruppen wurden über drei Tage um 7 und 19 Uhr mit Kochsalz oder Clenbuterol in Tagesdosen von 100, 500, 1000, 2000 und 4000 µg s.c. gespritzt (Abb. 16). In der Gruppe, die die höchste Clenbuterolgabe erhielt (4000 µg/Tier/die), starben die Hälfte der Tiere während der Behandlung.
Der Basalwert der Tuben (Kontrollen) lag bei 263 (211 - 326) pmol cAMP/mg Protein·20 min und fiel kontinuierlich ab. Die geringste AC- Aktivität mit 113 (94 - 135) pmol zeigte sich in der Gruppe, die mit der Tagesdosis von 1000 µg behandelt worden war ($p < 0.005$). Die Kurve stieg dann allerdings nochmals auf einen Wert von 161 (143 - 182) pmol bei den Tieren an, die 2000 µg pro Tag bekommen hatten.
Das untersuchte Uterusgewebe stammte von denselben Versuchstieren. Der Basalwert (Kontrollen) betrug 227 (202 - 255) pmol cAMP/mg Protein·20 min und fiel ebenfalls signifikant ($p < 0.005$) ab auf einen Minimalwert von 112 (97 - 129) pmol unter derselben Tagesdosis von 1000 µg/Tier. Auch hier stieg anschließend die AC- Aktivität wieder an und erreichte Werte von 143 (128 - 159) pmol unter 2000 µg bzw. 216 (185 - 251) pmol mit 4000 µg.

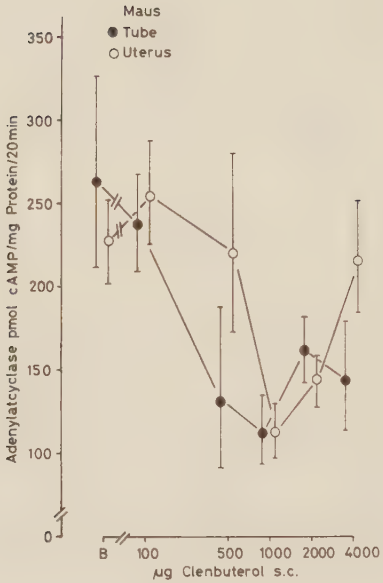

Abb. 16 Adenylatcyclaseaktivität von Tube ● — ● und Uterus ○ — ○ der Maus nach täglicher s.c. Gabe von 100 bis 4000 µg Clenbuterol pro Maus über drei Tage (n = 6/Dosis).
Abszisse: logarithmischer Maßstab.

3.11. Intrazellulärer cAMP- Spiegel der Tube der Maus in vivo nach dreitägiger Clenbuterolgabe

Abb. 17 zeigt vergleichend die AC- Aktivität der Tube (Kurve der Abb. 16) und den intrazellulären cAMP- Spiegel von Clenbuterol vorbehandelten Mäusen (Tötung durch Mikrowellenbestrahlung für 5 sec). Die Behandlung der Mäuse erfolgte wie unter 3.10. beschrieben. Der basale cAMP- Spiegel der Kontrollgruppe lag bei 7,4 (6,7 - 8,2) pmol/mg Protein und stieg auf einen Wert von 15,3 (13,4 - 17,5) pmol ($p < 0,005$) bei den Tieren an, die eine Tagesdosis von 1000 µg Clenbuterol erhalten hatten. Die Kurve fiel dann wieder auf einen cAMP- Gehalt von 8,2 (7,0 - 9,6) pmol unter einer Dosierung von 2000 µg Clenbuterol/Tier/die ab.

3.12. Adenylatcyclase und Phosphodiesterase der Tube von Mäusen ohne und mit 5 sec Mikrowellenbestrahlung

Um abzuklären, ob sich der cAMP- Spiegel nach einer Mikrowellenbestrahlung von 5 sec (wie in Versuch 3.11.) durch nicht inaktivierte Enzymaktivitäten postmortal ändert, wurden Mäuse im Mikrowellenofen getötet und anschließend die Aktivitäten von AC und Phosphodiesterase mit denen von dekapitierten, nicht bestrahlten Mäusen verglichen (Abb. 18).
Wie diese Abbildung zeigt, lag die Basalaktivität der AC bei den dekapitierten Mäusen bei 288 (222 - 373) pmol cAMP/mg Protein·20 min, dagegen die der bestrahlten Tiere bei 91 (67 - 123) pmol. Die Stimulation mit 10^{-2} mol/l NaF ergab eine Erhöhung der AC- Aktivität auf 1967 (1768 - 2190) pmol bei nicht bestrahlten Mäusen, während mit 97 (74 - 126) pmol nach 5 sec Mikrowellenbestrahlung der Wert sich nicht vom entsprechenden Basalwert unterschied.
Die Phosphodiesteraseaktivität betrug bei nicht behandelten Mäusen, die durch Dekapitation getötet worden waren, 489 (418 - 573) pmol cAMP/mg Protein·1 min, die der im Mikrowellenofen getöteten Tiere war auf eine cAMP- Abbaurate von 23 (10 - 54) pmol reduziert.

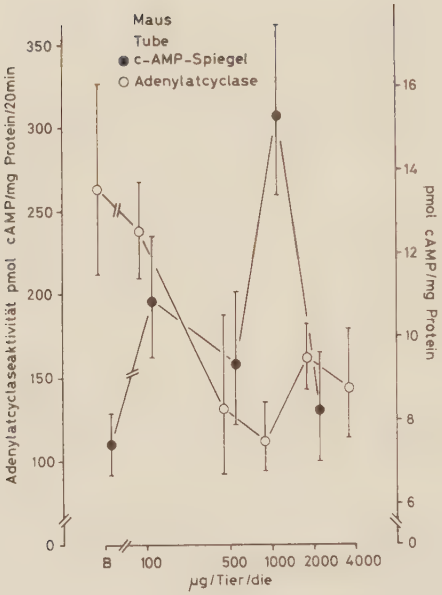

ABB. 17 ADENYLATCYCLASEAKTIVITÄT O — O UND INTRAZELLULÄRER cAMP- SPIEGEL ● — ● DER TUBE DER MAUS NACH TÄGLICHER S.C. GABE VON 100 BIS 4000 µG CLENBUTEROL PRO MAUS ÜBER DREI TAGE (N = 6/DOSIS).
ABSZISSE: LOGARITHMISCHER MAßSTAB.

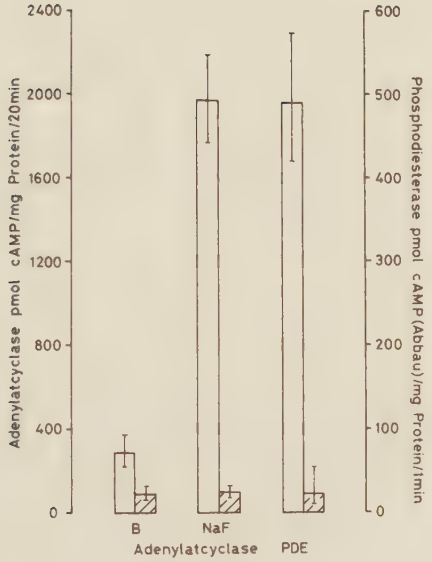

Abb. 18 Phosphodiesterase, basale und NaF (10^{-2} mol/l) stimulierte Adenylatcyclase der Tube der Maus dekapitierter ☐ und Mikrowellen behandelter ▨ Tiere (n = 4).

4. DISKUSSION

In zahlreichen Untersuchungen konnte bisher gezeigt werden, daß durch Stimulation des AC- Systems mit verschiedenen adrenergen ß - Mimetika die intrazelluläre Konzentration von cAMP zunimmt und parallel dazu eine Unterdrückung der Spontanmotilität und eine Relaxation von Uterus und Tube resultiert (Dobbs und Robison, 1968; Coutinho, 1970,1971, 1974; Triner et al. 1971; Polacek und Daniel, 1971; Vesin und Harbon, 1974; Uruno et al. 1974; Kroeger und Marshall, 1974; Johansson und Andersson, 1978).

4.1. Wirkung von Fenoterol und Clenbuterol auf die Adenylatcyclaseaktivität von Tube und Uterus der Maus

Auch in den vorliegenden Untersuchungen (Abb. 6 und 7) stimulierte Fenoterol die AC von Tube und Uterus konzentrationsabhängig. Diese Daten entsprechen den Befunden von Kords (1977), der eine dosisabhängige Zunahme des intrazellulären cAMP- Gehalts am Rattenuterus und gleichzeitig ein Sistieren der uterinen Kontraktionen feststellen konnte, und auch denen von Fleckenstein (1971), der ebenfalls diese Wirkung von Fenoterol auf den Rattenuterus beschrieb. Die Tubenmuskulatur wurde von diesen Autoren nicht untersucht.
Übereinstimmend mit Fenoterol ergab sich auch für Clenbuterol in beiden Geweben (Tube und Uterus) eine konzentrationsabhängige AC- Aktivitätszunahme, wobei sich eindeutige Unterschiede zwischen den adrenergen $ß_2$ - Sympathomimetika hinsichtlich maximaler Wirksamkeit ("Efficacy") und "Potency" nicht feststellen ließen. Auch wenn es den Anschein hatte, daß die Maximaleffekte mit ca. 10fach niedereren Fenoterolkonzentrationen erreicht werden, kann bei der großen Streuung der Werte nichts endgültiges darüber ausgesagt werden. M.L. Cohen et al. (1982) beschreiben Clenbuterol bezüglich dessen Wirkung auf den Vorhof und die Vena jugularis der Ratte als partiellen Agonisten mit antagonistischer Wirkung zum Isoproterenol.
In diesen Experimenten wurde nur eine submaximale Relaxation

der glatten Muskulatur der Vena jugularis durch Clenbuterol im Vergleich zu anderen β_2 - Mimetika beobachtet, was den eigenen Beobachtungen an Tube und Uterus nicht unbedingt entspricht.

4.2. Wirkung von Fenoterol auf die Adenylatcyclase der menschlichen Tube

Fenoterol stimulierte die AC der menschlichen Tube konzentrationsabhängig, maximal durch 10^{-4} mol/l (Abb. 8 und 9). Der starke Abfall der AC- Aktivität bei höheren Konzentrationen (allerdings nur in zwei Gewebeproben gemessen) könnte eventuell der Beobachtung von Krall et al. (1980) entsprechen, welche eine schnelle Aktivitätsminderung der Lymphozyten- AC unter Isoprenalininfusionen beschreiben, und auch den Befunden von Johansson und Andersson (1978), die eine AC- Aktivitätsminderung im Rattenuterus unter Konzentrationen von 10^{-2} mol/l Isoprenalin fanden. Erb (1971) konnte an menschlichen Uteri und Tuben eine völlige Unterdrückung der Motilität und eine Abnahme der Kontraktionsamplitude durch Fenoterol feststellen. Andere adrenerge ß - Mimetika zeigten ebenfalls eine Unterdrückung der Spontanmotilität und Relaxation der menschlichen Tuben (Coutinho et al. 1974). Somit muß aus den eigenen Untersuchungen geschlossen werden, daß diese Effekte über cAMP vermittelt werden. Da für die hormonelle Stimulation der AC generell GTP erforderlich ist, wurde die Fenoterolstimulation der AC der menschlichen Tube ohne und mit dem stabilen GTP- Analog (GMP-PNP) wiederholt. In diesen Versuchen zeigte sich, daß die geringe Fenoterolstimulation durch diese Maßnahme nicht gesteigert werden konnte, allerdings hob GMP-PNP die AC- Aktivität auf ein rund 500 pmol höheres Niveau an. Dieses Ergebnis wäre damit erklärbar, daß die für die hormonelle Stimulierung erforderliche GTP- Menge bereits im Gewebehomogenat in ausreichender Menge vorhanden ist und daß zusätzliches GMP-PNP zwar die AC auf ein höheres Aktivitätsniveau anhebt, aber für eine weitere Steigerung der Stimulierung durch Fenoterol nicht benötigt wird. Genauere Bindungs- und

Aktivierungsuntersuchungen der AC finden sich bei Frolich (1982).

4.3. Wirkung von Clenbuterol auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Ratte

Die Clenbuterolwirkung auf die AC dieser Spezies war nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 10 und 11); am Uterus ließ sich überhaupt keine Konzentrationsabhängigkeit demonstrieren. Um eine eventuelle Sensibilisierung des AC- Systems zu erfassen, wurden Ratten des gleichen Stammes über eine Woche mit Östrogenen behandelt und die AC auch unter diesen Bedingungen gemessen. Dabei konnte eine permissive Wirkung der Östrogene auf den ß- Rezeptor- AC- Komplex nicht festgestellt werden. Die am Tubengewebe ermittelten Kurven waren so gut wie identisch; am Uterus zeigte sich zwar eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit, die aber auch nicht eindeutig genug ausfiel, um statistisch gesicherte Unterschiede zu berechnen. In der Literatur werden auch diesbezüglich nur Sensibilisierungen des AC-Systems verschiedener Spezies für adrenerge ß - Mimetika in der lutealen Zyklusphase, bzw. unter Einfluß von Progesteron, beschrieben (Sim und Chantharaksri, 1973; Lindblom et al. 1980; Coutinho, 1971). Auch beim menschlichen Gewebe wird eine eindeutig verstärkte Wirkung von adrenergen ß - Mimetika nur am graviden bzw. unter Progesterondominanz stehenden Uterus beschrieben (Czekanowski et al. 1973; Erb, 1971).

4.4. Einfluß adrenerger Alpha- und Beta- Blocker auf die mit Fenoterol stimulierte Adenylatcyclase der Maus

Sowohl an der Tube als auch am Uterus der Maus konnte gezeigt werden, daß Fenoterol seine Wirkung auf die AC über adrenerge ß- Rezeptoren ausübt, da nach deren Blockade mit Propranolol die AC- Aktivität konzentrationsabhängig auf fast basale Werte abfiel (Abb. 12 und 13). Eine Aktivitätszunahme der AC durch adrenerge Alpha- Blocker war vorhanden und konnte bei 10^{-6} mol/l Phentolamin statistisch gesichert werden. Da bekannt

ist, daß eine Hemmung der AC über eine Aktivierung des adrenergen $Alpha_2$ - Rezeptors erfolgen kann, könnte die Wirkung von Phentolamin darauf beruhen, daß die unspezifische Stimulierung dieses Rezeptortyps durch Fenoterol auf diese Weise ausgeschaltet wird und eine höhere Aktivität resultiert. Ob eine derartige Kombination - adrenerges $ß_2$ - Stimulans plus adrenerger $Alpha_2$ - Antagonist - bei der Tokolyse therapeutisch ausgenützt werden könnte, muß allerdings dahingestellt bleiben. Die doch deutlichere maximale Stimulation mit Fenoterol in diesen Versuchen könnte eventuell auf eine schonendere Homogenisationstechnik zurückgeführt werden, die im Verlauf der Untersuchungen zur Anwendung kam (Diamond et al. 1966; Dobbs und Robison, 1968; Triner et al. 1971; Liddle et al. 1971).

4.5. Einfluß von Propranolol auf die mit Fenoterol und Relaxin stimulierte AC der Tube der Maus

Relaxin aktivierte die AC der Tube der Maus signifikant (Abb. 14). Die Fenoterolstimulierung war stärker und ließ sich wie auch schon vorher gezeigt, durch Propranolol auf fast basale Werte senken. Unter Relaxin ergab sich durch die Zugabe des ß - Blockers sogar eine leichte Zunahme der AC- Aktivität. Diese Ergebnisse werden durch Sanborn et al. (1980) und andere bestätigt (Braddon, 1978; Cheah und Sherwood, 1979; Porter et al. 1979). St. Louis (1982) beschreibt ebenfalls eine vollkommene Wirkungsaufhebung von Isoproterenol durch ß - Blockade, aber darüber hinaus auch eine 45%ige Reduktion der Relaxinwirkung. Er schließt daraus, ähnlich wie Rudzik und Miller (1962), daß ein Teil der Relaxinwirkung indirekt durch Freisetzung endogener Catecholamine erfolgt. Da sich in den eigenen Versuchen unter Zugabe von Propranolol eine leichte Steigerung der AC- Aktivität ergab, kann die Ansicht dieser Autoren nicht bestätigt werden.

4.6. In-vivo Applikation von Clenbuterol: Wirkung auf die Adenylatcyclase von Tube und Uterus der Maus

Die Applikation verschiedener Dosen (10, 50, 100, 500 und 1000 µg i.p.) 2 h vor Bestimmung der AC (Abb. 15) ergab in Tube und Uterus übereinstimmend einen sehr uneinheitlichen Kurvenverlauf. Ob ein systematischer Fehler bei der Bestimmung der Proben zu diesem Ergebnis geführt hat, ist nicht bekannt. Jedenfalls ließ sich durch in-vivo Applikation der zuvor beschriebene in-vitro Effekt nicht nachvollziehen und eine Dosisabhängigkeit nicht demonstrieren.
Bei längerer Applikation von Clenbuterol über drei Tage zeigte sich ebenfalls im Tuben- und Uterusgewebe keine dosisabhängige Zunahme der AC- Aktivität, sondern im Gegenteil eine Abnahme mit steigender Dosis, die unter 1000 µg Clenbuterol zu einer ausgesprochenen Aktivitätsminderung führte (Abb. 16). Diese AC- Aktivitätsabnahme könnte eventuell durch eine Verminderung der Rezeptoren der Zelloberfläche zustande kommen, denn ähnliche Phänomene wurden auch von anderen beschrieben (Mukherjee et al. 1976; Benoy et al. 1975; Johansson und Andersson, 1978). Nach heutigen Vorstellungen geht eine Desensibilisierung des AC- Systems mit einer Abnahme der Rezeptorenzahl einher, wie in Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Antagonisten gezeigt werden konnte. Neuere Ergebnisse zeigen auch, daß diese Abnahme über einen pinozytotischen Vesikeleinschluß der Rezeptoren erfolgen könnte (Stadel et al. 1983). Sogar Übertragungen dieser Vesikel auf rezeptorfreie Plasmamembranen, deren Zellen aber den katalytischen Teil des AC- Systems aufwiesen (Xenopus laevis Erythrozyten), wurden erfolgreich durchgeführt (Stulovici, 1983). Um zu sehen, ob diese Abnahme der AC- Aktivität auch möglicherweise Auswirkungen auf die Relaxation der glatten Muskulatur bei der Tokolyse hat, wurde der für diesen Effekt maßgebende "second messenger", das cAMP, direkt bestimmt. Interessanterweise verhielt sich der intrazelluläre cAMP- Spiegel jedoch fast umgekehrt proportional zur AC- Aktivität (Abb. 17), d.h. bei minimaler cAMP- Syntheserate (bei

1000 µG) zeigte sich der höchste cAMP- Spiegel. Insofern kann davon ausgegangen werden, daß bei der Tokolyse, wo ebenfalls sehr hohe Dosen verabreicht werden, die Aktivität der AC zwar abfällt, die für die Relaxation erforderliche Mediatorkonzentration jedoch stark erhöht ist. Wie diese überaus interessanten molekularbiologischen Vorgänge in der Zelle zustande kommen, ist bis jetzt noch nicht klar. Bei einer verringerten Syntheserate von cAMP muß man auch einen reduzierten Abbau des intrazellulären Mediators durch die Phosphodiesterase annehmen, wenn man die erhöhten Spiegel plausibel erklären will. Daß es sich tatsächlich um erhöhte cAMP- Spiegel handeln muß, d.h. daß die cAMP- Konzentration in vivo auch wirklich erfaßt wurde, konnte durch die abschließenden Versuche (Abb. 18) verifiziert werden. Unter Mikrowellenbestrahlung, denn unter diesen Bedingungen wurde das hitzestabile cAMP bestimmt, war die Aktivität sowohl der AC als auch der Phosphodiesterase in ausreichendem Maße reduziert und diese Enzyme durch die Hitzeentwicklung soweit denaturiert, daß postmortal bis zur endgültigen Inaktivierung des Gewebes keine Veränderung des cAMP-Spiegels befürchtet werden mußte. Ruoff (1977) konnte bei Ratten ebenfalls über eine Denaturierung dieser Enzyme durch die Behandlung der Versuchstiere im Mikrowellenofen zeigen, daß bei entsprechend hohen intraabdominellen Temperaturen AC und Phosphodiesterase ausreichend inaktiviert sind und stabile in-vivo cAMP- Werte gemessen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß adrenerger β_2 - Rezeptoragonisten auf die glatte Muskulatur des Uterus wird zur Reduktion der Wehentätigkeit therapeutisch ausgenützt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung dieser Substanzklasse (Fenoterol, Clenbuterol) und die des Peptidhormons Relaxin auf das Adenylatcyclase-cAMP- System von Uterus und Tube verschiedener Spezies (Maus, Ratte, Mensch) unter verschiedenen Bedingungen untersucht, um das adrenerge Rezeptorsystem in beiden Organen näher zu charakterisieren.

Als Maß der Aktivität der Adenylatcyclase (AC) wurde das pro Zeiteinheit neu synthetisierte cAMP in den Gewebshomogenaten bestimmt. Außerdem wurde in einigen Versuchen der aktuelle cAMP- in- vivo- Spiegel nach Mikrowellenbehandlung der Tiere gemessen.

Fenoterol und Clenbuterol aktivierten die AC aus Tube und Uterus der Maus konzentrationsabhängig im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/l, ein Effekt, der durch Propranolol (adrenerge Betarezeptorenblockade) nicht aber durch Phentolamin (adrenerge Alpharezeptorenblockade) hemmbar war. Unter Relaxin kam es ebenfalls zu einer signifikanten Aktivierung des Enzyms, die jedoch durch Propranolol nicht beeinflußt wurde. Die Adenylatcyclase aus Uterus und Tube der Ratte zeigte nur eine geringgradige Aktivierbarkeit in Gegenwart von Clenbuterol, die auch mittels einer Estradiolvorbehandlung der Tiere nicht gesteigert werden konnte. Demgegenüber war die AC aus Operationspräparaten menschlicher Tuben durch Fenoterol eindeutig stimulierbar, maximal durch 10^{-4} mol/l. Zusatz von GMP-PNP, einem stabilen GTP- Analog, zum Inkubationsmedium erhöhte nur die basale Aktivität der menschlichen Tuben- AC, nicht jedoch den Grad der Stimulierbarkeit durch Fenoterol. Durch Vorbehandlung der Mäuse mit Clenbuterol (i.p. oder s.c.) ließ sich eine Aktivierung der AC von Tube und Uterus nicht nachweisen. Im Gegenteil, in- vivo- Gabe hoher Dosen (1000 µg/Maus/die) über längere Zeit (drei Tage) reduzierte signifikant die Aktivität des Enzyms, obwohl gleichzeitig der aktuelle

cAMP- Spiegel in vivo zunahm.
Die Ergebnisse zeigen: (1) Sowohl Uterus als auch Tubenmuskulatur reagieren auf adrenerge β_2 - Rezeptorenstimulation mit einer entsprechenden Aktivierung des AC- cAMP- Systems. (2) Auch Relaxin aktiviert dieses System der Tube, sehr wahrscheinlich über einen spezifischen Relaxinrezeptor, da das adrenerge Betarezeptorensystem als Angriffspunkt ausgeschlossen werden konnte. (3) Exogene adrenerge β_2 - Agonisten bewirken in hoher Dosierung einen erhöhten cAMP- Spiegel in der Tubenmuskulatur der Maus in vivo, führen aber gleichzeitig zu einer Abnahme der meßbaren AC- Aktivität, wahrscheinlich über eine Adaptation und Desensibilisierung des Betarezeptor- AC- Komplexes.

6. LITERATUR

1. AHLQUIST, R.P.: A study of the adrenergic receptors. Amer. J. Phys. 153:586 - 600 (1948)

2. ANDERSSON, R.G.G., BERG, G., JOHANSSON, S.R.M., RYDEN, G.: Effects of non-selective and selective beta-adrenergic agonists on spontaneous contractions and cyclic AMP-levels in myometrial strips from pregnant women. Gyn. Obstet. Invest. 11:286 - 293 (1980)

3. BATRA, S.: The role of calcium binding by subcellular particles in the contraction and relaxation of the myometrium. Amer. J. Obstet. Gynec. 112:851 - 856 (1972)

4. BELT, W.D., ANDERSON, L.L., CAVAZOS, L.F., MELAMPY, R.M.: Cytoplasmic granules and relaxin levels in porcine corpora lutea. Endocrin. 89:1 - 10 (1971)

5. BENOY, C.J., EL-FELLAH, M.S., SCHNEIDER, R., WADE, O.L.: Tolerance to sympathicomimetic bronchodilatators in guinea-pig isolated lungs following chronic administration in vivo. Brit. J. Pharmacol. 55:547 - 554 (1975)

6. BRADDON, S.A.: Relaxin-dependent adenosine 3;5'-monophosphate concentration changes in the mouse symphysis. Endocrin. 102:1292 - 1299 (1978)

7. BÜLBRING, E., TOMITA, T.: The effect of catecholamines on the membrane resistance and spike generation in the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. J. Physiol. 194:74p - 76p (1967)

8. O'BYRNE, E.M., STEINETZ, B.G.: Radioimmunoassay of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152:272 - 276 (1976)

9. CHAMLEY, W.A.: Relaxin: biological actions. 10th Annual Meeting of the Soc. of Reprod., Austin, Tex. (Abstract) p.63 (1977)

10. CHEAH, S.H., SHERWOOD, O.D.: Target tissues for relaxin in the rat: tissue distribution of injected ^{125}I-labeled relaxin and tissue changes in cyclic AMP-levels after in vitro relaxin incubation. 61st Annual Meeting of the Endocrine Soc., Anaheim, Ca. (Abstract) p.579 (1979)

11. CHEAH, S.H., SHERWOOD, O.D.: Target tissues for relaxin in the rat: tissue distribution of injected ^{125}I-labeled relaxin and tissue changes in adenosine 3;5'-monophosphate levels after in vitro relaxin incubation. Endocrin. 106: 1203 - 1209 (1980)

12. COHEN, M.L., WILEY, K.S., BEMIS, K.G.: Analysis of the $beta_1$- and $beta_2$- adrenoreceptor interactions of the partial agonist Clenbuterol (NAB 365) in the rat jugular vein and atria. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmac. 320: 145 - 151 (1982)

13. COHEN, P.: The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature 296: 613 - 620 (1982)

14. COHEN, P.: The role of cyclic AMP dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. Curr. Top. Cell Regul. 14:117 - 196 (1978)

15. COUTINHO, E., MAIA, H., FILHO, J.A.: Response of the human fallopian tube to adrenergic stimulation. Fert. Steril. 21:590 - 594 (1970)

16. COUTINHO, E.: Physiologic and pharmacologic studies of the human oviduct. Fert. Steril. 22:807 - 815 (1971)

17. COUTINHO, E., MAIA, H., FILHO, J.A.: The inhibitory effect of Ritodrine^{R} on human tubal activity in vivo. Fert. Steril. 25:595 - 601 (1974)

18. CZEKANOWSKI, R., MOSLER, K.H.: Über den Einfluß kontrahierender und hemmender Substanzen auf Perfusionsdruck und Kontraktilität des nichtschwangeren menschlichen Uterus in vitro. Arch. Gynäk. 215:39 - 52 (1973)

19. CZEKANOWSKI, R., MOSLER, K.H., SCHWALM, H.: Über den Einfluß von Aminophyllin auf die Kontraktilität des menschlichen Uterus. Drug Res. 23:1586 - 1590 (1973)

20. CZEKANOWSKI, R.: The action of betamimetics on the myometrium. Labour Inhibition - Betamimetic Drugs in Obstetrics, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-N.Y. pp. 11 - 22 (1977)

21. DALE, H.H.: On some physiological actions of Ergotamine. J. Physiol. London 34:163 - 206 (1906)

22. DIAMOND, J., BRODY, T.M.: Hormonal alteration of the response of the rat uterus to catecholamines. Life Sci. 5:2187 - 2193 (1966)

23. DIAMOND, J.: Phosphorylase, calcium, and cyclic AMP in smooth muscle contraction. Amer. J. Physiol. 225:930 - 937 (1973)

24. DOBBS, J.W., ROBISON, G.A.: Function and biochemistry of beta-receptors in the uterus. Fed. Proc. 27:352 (1968)

25. ERB, H.: Zur Relaxation von Uterus und Tube durch Betasympathomimetika. Zentralb. Gynäk. 93.Jhg. Heft 16:513 - 518 (1971)

26. FLECKENSTEIN, A., GRÜN, G., TRITTHART, H., BYON, K.: Uterusrelaxation durch hochaktive Calcium-antagonistische Hemmstoffe der elektromechanischen Koppelung wie Isoptin^{R} (Verapamil, Iproveratril), Substanz D-600 und Segontin^{R} (Prenylamin). Wien. Klin. Wschr. 49:32 - 41 (1971)

27. FROLICH, M., KRALL, J.F., STAHL, R.E., KORENMAN, S.G.: Multiphasic activation of smooth muscle adenylate cyclase by pretreatment with Guanyl-5'yl-Imidodiphosphate (Gpp(NH)p) suggests multiple enzyme populations. Arch. Biochem. Biophys. 217:473 - 478 (1982)

28. GILMAN, A.G.: A protein binding assay for adenosine 3;5' cyclic monophosphate. Proc. Nation. Acad. Sci. 67:305 - 312 (1970)

29. HARBON, S., CLAUSER, H.: Cyclic adenosine 3;5' monophosphate levels in rat myometrium under the influence of epinephrine, prostaglandines and Oxytocin. Correlation with uterus motility. Biochem. Biophys. Res. Comm. 44: 1496 - 1503 (1971)

30. HARDELAND, R.: Das zyklische Adenosin 3;5'-Monophosphat als regulatorische Mittlersubstanz. Naturw. Rundsch. 24:199 - 207 (1971)

31. HEILBRUNN, L.V., WIERCENSKI, F.J.: The action of various cations on muscle protoplasm. J. Cell. Comp. Physiol. 29:15 - 32 (1947)

32. JOHANSSON, S.R.M., ANDERSSON, R.G.G.: Effects of Isoprenaline on the time course of the cyclic AMP level in the rat uterus. Acta Pharmacol. Toxicol. 42:347 - 353 (1978)

33. JOHANSSON, S.R.M., ANDERSSON, R.G.G.: Effects of beta-adrenergic agonists on rat uterine motility and cAMP level in vivo. Acta Pharmacol. Toxicol. 47:5 - 10 (1980)

34. IRMER, M., TROLP, R., POHL, C., BERNIUS, U., HILLEMANNS, H.G., STEIN, H.: Klinische Anwendung einer kombinierten β_2-Stimulation und β_1-Blockade bei Tokolysetherapie. Drug Res. 30:105 - 109 (1980)

35. KAHN, C.R.: Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J. Cell. Biol. 70:261 - 286 (1976)

36. KORDS, H.: Pharmacology and pharmacokinetics of Partusisten (Fenoterol). Labour Inhibition - Betamimetic Drugs in Obstetrics, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-N.Y. pp.41 - 45 (1977)

37. KRALL, J.F., CONNELLY, M., TUCK, M.L.: Acute regulation of beta-adrenergic catecholamine sensitivity in human lymphocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 214:554 - 560 (1980)

38. KROEGER, E.A., MARSHALL, J.M.: Beta-adrenergic effects on rat myometrium: role of cyclic AMP. Amer. J. Physiol. 226:1298 - 1303 (1974)

39. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J., PRICER, W., PASTAN, I.: ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-^{125}I and its relation to adenyl cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:745 - 752 (1970)

40. LIDDLE, G.W., HARDMAN, J.G.: Cyclic adenosine monophosphate as a mediator of hormone action. N. Engl. J. Med. 285:560 - 566 (1971)

41. LINDBLOM, B., HAMBERGER, L.: Cyclic AMP and contractility of the human oviduct. Bio. Reprod. 22:173 - 178 (1980)

42. LIPPERT, T.H., DeGRANDI, P.B., FRIDRICH, R.: Actions of the uterine relaxant Fenoterol on uteroplacental hemodynamics in human subjects. Amer. J. Obstet. Gynec. 125: 1093 - 1098 (1976)

43. St.LOUIS, J.: Pharmacological studies on the action of relaxin upon KCl-contracted rat uterus. Pharmacol. 25: 327 - 337 (1982)

44. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265 - 275 (1951)

45. MAIA, H., COUTINHO, E.: Cyclic AMP and oviduct contractility. Physiol. Genet. Reprod. Part B p.167 - 176 (1974)

46. MUKHERJEE, C., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.: Regulation of adenylate cyclase coupled ß-adrenergic receptors by ß-adrenergic catecholamines. Endocrin. 99:347 - 357 (1976)

47. MERCADO-SIMMEN, R.C., BRYANT-GREENWOOD, G.D., GREENWOOD, F.C.: Relaxin receptor in the rat myometrium: regulation by estrogen and relaxin. Endocrin. 110:220 - 226 (1982)

48. MITZNEGG, P., HEIM, P., MEYTHALER, B.: Influence of endogeneous and exogeneous cyclic 3;5'-AMP on contractile responses by oxytocin and calcium in isolated rat uterus. Life Sci. 9:121 - 128 (1970)

49. PATERSON, G.: The nature of the inhibition of the rat uterus by relaxin. J. Pharm. Pharmacol. 17:262 - 264 (1965)

50. PÖCH, G.: Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3;5'-AMP as substrate. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 268:272 - 299 (1971)

51. POLACEK, J., DANIEL, E.E.: Effect of alpha- and beta-adrenergic stimulation on the uterine motility and adenosine 3;5'-monophosphate level. Can. J. Physiol. Pharmacol. 49:988 - 998 (1971)

52. PORTER, D.G., DOWNING, S.J., BRADSHAW, J.M.C.: Relaxin inhibits spontaneous and Prostaglandine driven myometrial activity in anesthesized rats. J. Endocrin. 83:183 - 192 (1979)

53. RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W.: Formation of cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J. Biol. Chem. 232: 1065 - 1076 (1958)

54. RASMUSSEN, H.: Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. Science 170:404 - 412 (1970)

55. RASMUSSEN, H., TENENHOUSE, A.: Cyclic adenosine monophosphate, calcium and membrane. Proc. Nat. Acad. Sci. 59: 1364 - 1370 (1968)

56. ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.: Adenylcyclase as an adrenergic receptor. Ann. N.Y. Acad. Sci. 139:703 - 723 (1967)

57. RODBELL, M.: The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284:17 - 22 (1980)

58. ROSS, E.M., GILMAN, A.G.: Biochemical properties of hormone sensitive adenylate cyclase. Ann. Rev. Biochem. 49: 533 - 564 (1980)

59. RUDZIK, A.D., MILLER, J.W.: The mechanism of uterine inhibitory action of relaxin containing ovarian extracts. J. Pharmacol. Exp. Ther. 138:82 - 87 (1962)

60. RUDZIK, A.D., MILLER, J.W.: The effect of altering the catecholamine content of the uterus on the rate of contractions and the sensitivity of the myometrium to relaxin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 138:88 - 95 (1962)

61. RUOFF, H.J.: Cyclic AMP and cyclic GMP in the rat gastric mucosa. The significance of post mortem changes and tissue fixation on the estimation of the in vivo level. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 298:167 - 173 (1977)

62. RUOFF, H.J., PAINZ, B., BECKER, M., RACK, M., SEWING, K.-Fr., MALCHOW, H.: Adenylate cyclase in human gastric mucosa: its activation in morphologically different biopsy specimens. Klin. Wschr. 57:725 - 730 (1979)

63. SANBORN, B.M., KUO, H.S., WEISBRODT, N.W., SHERWOOD, O.D.: The interaction of relaxin with the rat uterus I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity. Endocrin. 106:1210 - 1215 (1980)

64. SANBORN, B.M., SHERWOOD, O.D.: Effect of relaxin on bound cAMP in rat uterus. Endocrine Res. Comm. 8:179 - 192 (1981)

65. SANBORN, B.M., KUO, H.S., WEISBRODT, N.W., SHERWOOD, O.D.: Effect of porcine relaxin on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractions of the rat uterus. in ANDERSON: Relaxin, 15th Midwest Conference on Endocrinology and Metabolism, Columbia (1979), pp.273 - 282 Plenum Press, N.Y. 1982

66. SAROSI, P., SCHMIDT, C.L., ESSIG, M., STEINETZ, B.G., WEISS, G.: The effect of relaxin and progesterone on rat uterine contractions. Amer. J. Obstet. Gynec. 145:402 - 404 (1983)

67. SAWYER, W.H., FRIEDEN, E.H., MARTIN, A.C.: In vitro inhibition of spontaneous contractions of the rat uterus by relaxin containing extracts of sow ovaries. Amer. J. Physiol. 172:547 - 552 (1953)

68. SCHWABE, C., STEINETZ, B., WEISS, G., SEGALOFF, A., McDONALD, J.K.M., O'BYRNE, E., HOCHMAN, J., CARRIERE, J., GOLDSMITH, L.: Relaxin. Recent Proc. Horm. Res. 34:123 - 211 (1978)

69. SHERWOOD, O.D., ROSENTRETER, K.R., BIRKHIMER, M.L.: Development of an RIA for porcine relaxin using ^{125}I-labeled polytyrosylrelaxin. Endocrin. 96:1106 - 1113 (1975)

70. SIM, M.K., CHANTHARAKSRI, U.: Rat uterine contractility and the activity of uterine adenylcyclase and phosphodiesterase during the estrus cycle. Biochem. Pharmacol. 22:1417 - 1422 (1973)

71. STADEL, J.M., STRULOVICI, B., NAMBI, P., LAVIN, T.N., BRIGGS, M.M., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.: Desensitization of the ß-adrenergic receptor of frog erythrocytes. J. Biol. Chem. 258:3032 - 3038 (1983)

72. STRULOVICI, B., STADEL, J.M., LEFKOWITZ, J.: Functional integrity of desensitized ß-adrenergic receptors. J. Biol. Chem. 258:6410 - 6414 (1983)

73. SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W.: Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J. Biol. Chem. 232:1077 - 1091 (1958)

74. SUTHERLAND, E.W., ROBISON, G.A.: The role of cyclic 3';5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. Pharm. Rev. 18:145 - 151 (1966)

75. SUTHERLAND, E.W.: Studies on the mechanism of hormone action. Science 177:401 - 408 (1972)

76. TRINER, L., NAHAS, G.G., VULLIEMOZ, Y., OVERWEG, N.I.A., VEROSKY, M., HABIF, D.V., NAGAI, S.H.: Cyclic AMP and smooth muscle function. Ann. N.Y. Acad. Sci. 185:457 - 476 (1971)

77. URUNO, T., TAKAYANAGI, I., KUBOTA, K., TAKAGI, K.: Comparison of actions of Papaverine, Aspaminol, and Isoprenaline on isolated rat uterus. Jap. J. Pharmacol. 24:219 - 226 (1974)

78. VESIN, M.F., HARBON, S.: The effects of epinephrine, prostaglandins and their antagonists on adenosine cyclic 3;5' monophosphate concentrations and motility of the rat uterus. Mol. Pharmacol. 10:457 - 573 (1974)

79. WIQVIST, N., PAUL, K.G.: Inhibition of the spontaneous uterine motility in vitro as a bioassay for relaxin. Acta Endocrin. 29:135 - 146 (1958)

80. WIQVIST, N.: Desensitizing effect of exo- and endogeneous relaxin on the immediate uterine response to relaxin. Acta Endocrin. 32 (Suppl.) 46:3 - 14 (1959)

DANKSAGUNG:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ruoff für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit, sowie der Universitäts-Frauen-Klinik Tübingen, insbesondere Herrn Prof. Dr. Lippert für die Bereitstellung der in den Versuchen verwendeten Operationspräparate und den Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts für Anregungen und technische Unterstützung.

Lebenslauf

Am 3. Juni 1957 wurde ich, Stephan Hill, als erster Sohn von Joe und Hedwig Hill, geborene Rauwolf, in Killeen, Texas, USA geboren. Im Jahre 1962 übersiedelten wir in die Bundesrepublik Deutschland.

Von April 1964 bis August 1968 besuchte ich die Grundschule, Altenburgschule I, in Stuttgart-Bad Cannstatt, anschließend trat ich in das Johannes-Kepler-Gymnasium in Stuttgart-Bad Cannstatt ein, wo ich im Mai 1977 das Abitur ablegte.

Im April 1978 begann ich an der Universität Stuttgart-Hohenheim das Medizinstudium und wechselte nach zwei Semestern an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Im März 1980 bestand ich die ärztliche Vorprüfung in Tübingen. Den ersten Teil des medizinischen Staatsexamens legte ich im März 1981 in Tübingen und den zweiten Teil des medizinischen Staatsexamens im März 1983 in Reutlingen ab.

Im April 1983 trat ich das Praktische Jahr im Stuttgarter Robert-Bosch-Krankenhaus an.

Den dritten Teil des medizinischen Staatsexamens bestand ich am 10. April 1984 in Stuttgart.

Seit August 1984 bin ich als Assistenzarzt am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart tätig.